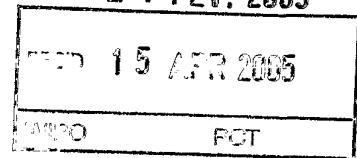


24 FEV. 2005



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 07 FEV. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE  
PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA RÈGLE  
17.1. a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

CRÉE PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951





## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: DATE DE DÉPÔT:	Jean LEHU BREVATOME 3, rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS France
Vos références pour ce dossier: B14647EE- DD2682	

<b>1 NATURE DE LA DEMANDE</b>			
Demande de brevet			
<b>2 TITRE DE L'INVENTION</b>			
		BRAS ESPACEUR MOLECULAIRE, PROCEDE DE FABRICATION, ET UTILISATIONS SUR UNE PUCE D'ANALYSE A MOLECULES OU BIOMOLECULES.	
<b>3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE</b>		Pays ou organisation	Date N°
<b>4-1 DEMANDEUR</b>			
Nom Rue Code postal et ville Pays Nationalité Forme juridique		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE 31-33, rue de la Fédération 75752 PARIS 15ème France France Etablissement Public de Caractère Scientifique, Technique et Ind	
<b>5A MANDATAIRE</b>			
Nom Prénom Qualité Cabinet ou Société Rue Code postal et ville N° de téléphone N° de télécopie Courrier électronique		LEHU Jean Liste spéciale: 422-5 S/002, Pouvoir général: 7068 BREVATOME 3, rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS 01 53 83 94 00 01 45 63 83 33 brevets.patents@brevalex.com	
<b>6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS</b>			
Texte du brevet Désignation d'inventeurs Pouvoir général		Fichier électronique textebrevet.pdf	Pages 38
		Détails D 29, R 8, AB 1	

<b>7 MODE DE PAIEMENT</b>				
Mode de paiement		Prélèvement du compte courant		
Numéro du compte client		024		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>				
Etablissement immédiat				
<b>9 REDEVANCES JOINTES</b>				
	Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
062 Dépôt	EURO	0.00	1.00	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)	EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème	EURO	15.00	16.00	240.00
Total à acquitter	EURO			560.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

**Signé par**

Signataire: FR, Brevatome, J. Lehu

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

**Fonction**

Mandataire agréé (Mandataire 1)



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

## Réception électronique d'une soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet : X

Demande de CU :

<b>DATE DE RECEPTION</b>	25 février 2004	
<b>TYPE DE DEPOT</b>	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	Dépôt en ligne: X
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI</b>	0450346	Dépôt sur support CD:
<b>Vos références pour ce dossier</b>	B14647EE- DD2682	

### DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Nombre de demandeur(s)	1
Pays	FR

### TITRE DE L'INVENTION

BRAS ESPACEUR MOLECULAIRE, PROCEDE DE FABRICATION, ET UTILISATIONS SUR UNE PUCE D'ANALYSE A MOLECULES OU BIOMOLECULES.

### DOCUMENTS ENVOYES

Design.PDF	ValidLog.PDF	fee-sheet.xml
package-data.xml	application-body.xml	textebrevet.pdf
FR-office-specific-info.xml	indication-bio-deposit.xml	request.xml
Requetefr.PDF		

### EFFECTUE PAR

Effectué par:	J. Lehu
Date et heure de réception électronique:	25 février 2004 11:09:19
Empreinte officielle du dépôt	FD:DA:F5:8C:22:74:C2:71:B0:BE:08:89:1D:D7:8F:44:E7:38:CF:04

/ INPI PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL  
INSTITUT 26 bis, rue de Saint Petersburg  
NATIONAL DE 75800 PARIS cedex 08  
LA PROPRIETE Téléphone : 01 53 04 53 04  
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 93 59 30

BRAS ESPACEUR MOLECULAIRE, PROCEDE DE FABRICATION, ET  
UTILISATIONS SUR UNE PUCE D'ANALYSE A MOLECULES OU  
BIOMOLECULES

DESCRIPTION

Domaine technique

5           La présente invention se rapporte à un bras  
espaceur moléculaire, à un procédé de préparation du  
bras espaceur reliant une unité moléculaire à un  
support solide, ainsi qu'à l'utilisation de ce bras  
espaceur sur des puces d'analyse à molécules ou  
10 biomolécules.

Dans l'exposé qui suit, les références entre  
crochets [] renvoient à la liste de références à la fin  
de la description.

15           Les puces d'analyse visées par la présente  
invention sont plus particulièrement, mais non  
exclusivement, les biopuces et microsystèmes dédiés à  
l'analyse biologique. Elles se répartissent en trois  
catégories : les puces à ADN, les laboratoires sur puce  
(« Lab-On-Chip ») et les puces à cellules  
20 (« Cell-On-Chip »).

Actuellement, un nouveau type de biopuce  
émerge : la puce à sucre (« Glycochip »). Cette biopuce  
est soit le résultat d'un dépôt d'une substance  
naturelle ou synthétique, soit le résultat d'une  
25 synthèse multiparallèle supportée (chimie combinatoire)  
de différentes séquences oligosaccharidiques,

représentatives de la diversité moléculaires de certaines grandes familles de glycoconjugués endogènes, par exemple les héparanes sulfates. La présente invention est particulièrement bien adaptée à ce  
5 nouveau type de biopuce en permettant notamment la fixation de ces molécules sur des supports de biopuces par un procédé de chimie efficace et simplifié par rapport à l'art antérieur.

Les molécules ou biomolécules, appelées dans la  
10 présente « unités moléculaires », qui peuvent être fixées sur un support solide par l'intermédiaire du bras espaceur de la présente invention peuvent être par exemple des acides nucléiques (ADN ou ARN), des sucres, des glycoprotéines, des glycolipides, etc. D'autres  
15 exemples encore sont donnés ci-dessous.

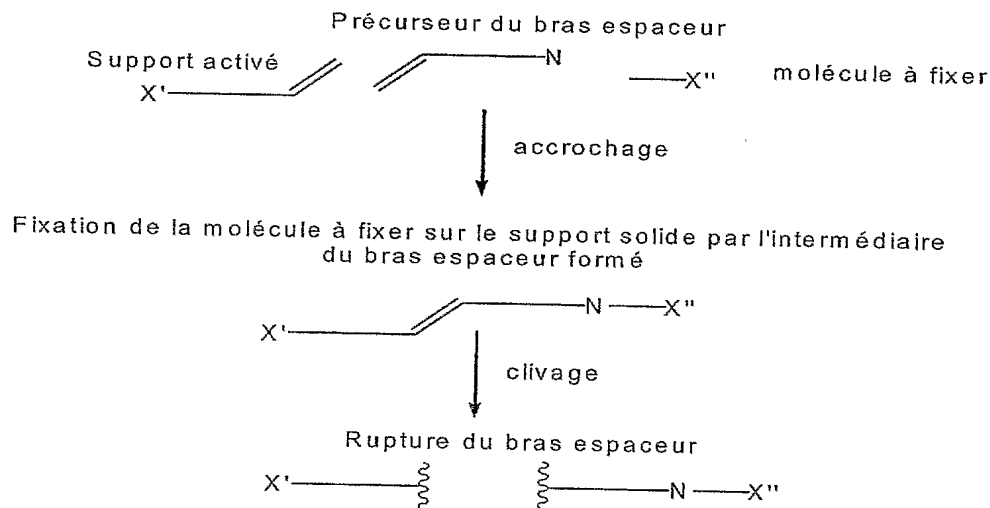
#### **Art antérieur**

Dans la majorité des biopuces, un espaceur fait le lien entre le support solide [2] et, par exemple,  
20 les sondes d'oligopeptides, d'oligonucléotides [3] ou d'oligosaccharides [4]. Cet espaceur peut jouer plusieurs rôles à la fois : molécule liante, bras d'éloignement spatial, lieu de clivage de la sonde, etc.

25 La proximité du support avec les sites de reconnaissance des cibles par les sondes peut en effet gêner, voire empêcher la reconnaissance sonde/cible, et donc nuire à la finesse et à la qualité d'analyse des biopuces. Ceci est particulièrement vrai lorsque les

sondes sont petites, par exemple dans le cas des puces à sucres.

L'équation de principe ci-dessous indique le schéma général de la formation puis du clivage de l'espaceur, dans laquelle  $X'$  représente un support solide, et  $X''$  une unité moléculaire.



De nombreux bras espaceurs ont été réalisés à ce jour, mais ceux-ci présentent un certain nombre d'inconvénients non résolus. En effet, leur structure implique une limitation sévère des procédés chimiques utilisables pour leur fixation sur le support solide et/ou ils ne permettent de fixer facilement tout type de molécule biologique et/ou ils sont si stables chimiquement qu'une fois fixés sur le support solide leur clivage pour récupérer la molécule biologique ne peut pas se faire facilement, et peut entraîner la détérioration de cette dernière ou du support.

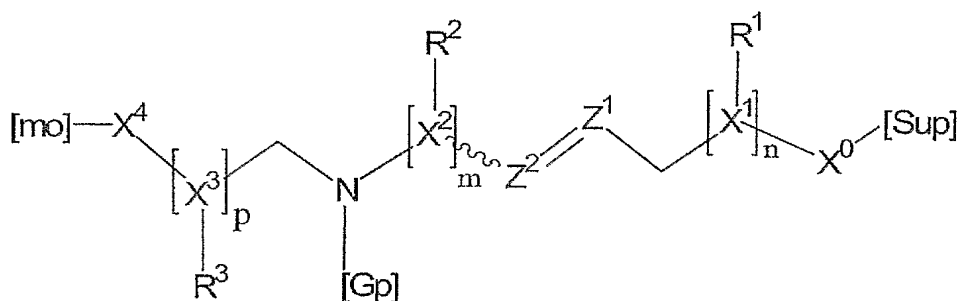
Le document [4] (US-A-6,579,725) décrit un bras espaceur fixant des oligosaccharides. Ce bras espaceur,



bien que plus efficace que ceux de l'art encore plus antérieur, ne permet pas de résoudre en même temps tous les problèmes précités. On peut noter également, que sa longueur, sa fonctionnalité, sa réactivité et son encombrement ne peuvent pas toujours être générés à volonté.

### Exposé de l'invention

La présente invention permet précisément de résoudre en une seule fois les problèmes précités de l'art antérieur en fournissant un bras espaceur moléculaire de formule (I) suivante :



(I)

- dans laquelle les substituants  $X^0$  ;  $X^1$  ;  $X^2$  ;  $X^3$  ;  $X^4$  ;  $Z^1$  ;  $Z^2$  ;  $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont tels que :

- $X^0$  et  $X^4$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Se, P, As, Si ;
- $X^1$  ;  $X^2$  ; et  $X^3$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Se, P, As, Si et parmi un aryle et un hétéroaryle comprenant par exemple chacun de 2 à 20 atomes de carbone ;

- $Z^1$  et  $Z^2$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C-R, Si-R, C, N, P et As, où R est un alkyle comportant par exemple de 1 à 40 atomes de carbone ;
- 5 •  $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi H, un alkyle, un aryle et un hétéroaryle comprenant chacun de 2 à 20 atomes de carbone ;
- [Gp] représente un groupement protecteur de  
10 l'amine secondaire -N- ou une molécule participant à la fonctionnalité du bras espaceur ;
  - dans laquelle n, m et p sont des nombres entiers, chacun supérieur ou égal à 1 et choisi indépendamment l'un de l'autre, de préférence de façon à ce que  $1 \leq n$ ,  
15 m et p  $\leq 40$  ;
  - dans laquelle [Sup] représente H ou un support solide silanisé sur lequel ledit bras espaceur peut être fixé de manière covalente ; et
  - dans laquelle [mo] représente H ou une unité  
20 moléculaire destinée à être fixée de manière covalente par l'intermédiaire dudit bras espaceur sur ledit support solide silanisé.

Ce bras espaceur (I) est utilisable, de manière générale, pour fixer sur un support solide [Sup] une  
25 unité moléculaire [mo], par exemple pour fabriquer une biopuce, ou plus avantageusement une puce à sucre, où [mo] est généralement une molécule fonctionnalisant ladite biopuce.

Selon l'invention, de préférence, dans le bras  
30 espaceur [1] tel que défini ci-dessus :

- $X^0$  et  $X^4$  peuvent être chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Si ; et/ou
- $X^1$  ;  $X^2$  ; et  $X^3$  peuvent être chacun choisis  
indépendamment des autres substituants parmi C, O,  
N, S, Si et parmi un aryle et un hétéroaryle  
comprenant par exemple chacun de 2 à 10 atomes de  
carbone ; et/ou
- $Z^1$  et  $Z^2$  peuvent être chacun choisis  
indépendamment des autres substituants parmi C, N,  
C-R, Si-R, où R est un alkyle comportant de 1 à 30  
atomes de carbone, de préférence de 1 à 20 atomes  
de carbone, de préférence de 1 à 10 atomes de  
carbone ; et/ou
- $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  peuvent être chacun choisis  
indépendamment des autres substituants parmi H, un  
alkyle, un aryle et un hétéroaryle comprenant  
chacun de 2 à 10 atomes de carbone.

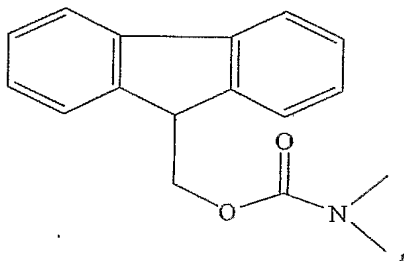
Selon l'invention, n, m et p peuvent aussi être  
choisis indépendamment l'un de l'autre de façon à ce  
que  $1 \leq n, m \text{ et } p \leq 30$ , de préférence de façon à ce que  
 $1 \leq n, m \text{ et } p \leq 20$ , et de préférence encore façon à ce  
que  $1 \leq n, m \text{ et } p \leq 10$ .

A titre d'exemple, selon l'invention, dans le  
bras espaceur [1] tel que défini ci-dessus,  $X^0$  et  $X^4$   
sont C ;  $X^1$  ;  $X^2$  ; et  $X^3$  sont C ;  $Z^1$  et  $Z^2$  sont C ;  
 $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont H.

Selon l'invention, le groupement protecteur  
[Gp] peut être l'un quelconque des groupements  
protecteurs d'amines secondaires connus de l'homme du

métier. Il est choisi de préférence de manière à ce qu'il résiste à la chimie de synthèse du bras espaceur, de sa fixation sur le support et de sa fixation avec l'unité moléculaire [mo]. Il peut être choisi par exemple parmi Ac, Bn (benzyle), un groupement aryle (R) en C<sub>1</sub> à 40, Troc, z, TCA, BOC, Fmoc, etc., pour former avec l'amine secondaire du bras espaceur (I) un des groupes chimiques suivants (>N- indique l'amine secondaire protégée) :

- 10 >N-Ac : acétamide (>N-CO-Me);  
 >N-Bn : benzylamide;  
 >N-R : arylamide en C<sub>1</sub> à 40 ;  
 >N-Troc : 2,2,2-trichloroéthyl carbamate (>N-C(O)OCH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>);  
 15 >N-z : benzyl carbamate (>N-C(O)OCH<sub>2</sub>Ph);  
 >N-TCA : trichloroacétamdate (>N-CO-CCl<sub>3</sub>);  
 >N-BOC : t-butyl carbamate (>N-C(O)OCMe<sub>3</sub>);  
 >N-Fmoc : 9-fluorènylméthyl carbamate :



- 20 (Ph = phényle et Me = méthyle).

De préférence, selon l'invention, le groupement protecteur est choisi parmi Ac, BOC ou un groupement aryle en C<sub>1</sub> à 40.

- 25 Selon l'invention, la molécule [Gp] participant à la fonctionnalité du bras espaceur peut être par

exemple un alkyle ou un aryle en  $C_1$  à 40, par exemple en  $C_1$  à 30, par exemple en  $C_1$  à 20 ou en  $C_1$  à 10. Il peut s'agir de tout substituant, pas forcément protecteur, qui peut participer à la fonctionnalité du bras espaceur  
5 lorsqu'il est utilisé. Il peut s'agir par exemple d'un groupement hydrophobe, permettant de rendre le bras espaceur plus spécifique et/ou plus sélectif vis-à-vis de la molécule [mo] à fixer, et/ou de son rôle lors de l'utilisation du bras espaceur, par exemple sur une  
10 puce à sucre ou à protéine.

Selon l'invention, le support solide peut être par exemple tout support pouvant être silanisé. Il peut s'agir par exemple de plaques, de billes ou de capillaires. Il peut être par exemple à base de silice,  
15 de verre, ou d'autres matériaux connus de l'homme du métier, par exemple pour fabriquer les supports ou surfaces de biopuces. La silanisation du support peut être réalisée par tout procédé connu de l'homme du métier.

20 Selon l'invention, l'unité moléculaire [mo] peut être une molécule naturelle ou synthétique. Il peut s'agir de toute molécule qui doit être fixée sur un support, par exemple pour des raisons analytiques. Il peut s'agir d'une petite molécule, par exemple ayant  
25 un poids moléculaire allant d'environ 180 à 400000  $g.mol^{-1}$ . Lorsqu'il s'agit d'un sucre, [mo] peut avoir par exemple un poids moléculaire allant de 180 à 10000  $g.mol^{-1}$ . Lorsqu'il s'agit d'une protéine ou d'un peptide, [mo] peut avoir par exemple un poids  
30 moléculaire allant de 5500 à 400000  $g.mol^{-1}$ ,

généralement allant de 5500 à 220000 g.mol<sup>-1</sup> (poids moléculaire de la plupart des protéines).

Cette unité moléculaire [mo] peut être par exemple choisie parmi les monosaccharides, les  
5 oligosaccharides, les poly-oligosaccharides, les glyco-  
conjugués, les peptides, les protéines, les enzymes,  
les glycoprotéines, les lipides, les acides gras, les  
glycolipides, les glycolipoprotéines, etc.

Parmi les monosaccharides, on peut citer le  
10 glucose, la glucosamine, azidoglucosamine, D-ribose, D-  
xylose, L-arabinose, D-glucose, D-galactose, D-mannose,  
2-désoxy-D-ribose, L-fucose, N-acétyl-D-glucosamine, N-  
acétyl-D-galactosamine, acide N-acétylneuraminique,  
acide D-glucuronique, acide L-iduronique, D-sorbitol,  
15 D-mannitol, etc.

Parmi les oligosaccharides, on peut citer  
saccharose, lactose, fragments d'héparanes sulfates,  
fragments saccharidiques d'héparine, de chondroïtine,  
de dermatanes sulfates, antigènes Lewis, etc.

20 Parmi les poly-oligosaccharides, on peut citer  
parties saccharidiques des héparanes sulfates, de  
l'héparine, de la chondroïtine, les dermatanes  
sulfates, etc.

Parmi les glyco-conjugués, on peut citer  
25 héparanes sulfates, héparine, chondroïtine, dermatanes  
sulfates, etc.

Parmi les peptides et les protéines, on peut  
citer chimiokines, cytokines, insuline, fibrinogène,  
myosine, hémoglobine, etc.

Parmi les enzymes, on peut citer oxydo-réductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases, ligases.

Parmi les glycoprotéines, on peut citer  
5 glycoprotéines, on peut citer immunoglobuline G, acide hyaluronique, etc.

Parmi les lipides, on peut citer lipides hydrolysables : les graisses (glycérol + 3 acides gras), les cires (acide gras + alcools gras), les  
10 esters de stérol (stérol + acides gras), phospholipides (acides phosphatidiques (glycérol, 2 acides gras + phosphate)), les phosphalides (glycérol + 2 acides gras + phosphate), les sphingolipides (sphingosine + acide gras + phosphate + aminoalcool) ; lipides non  
15 hydrolysables : alcanes, caroténoïdes, stérols (cholestérol), stéroïdes (estradiol, testostérone), acides (acides gras), eicosanoïdes, etc.

Parmi les acides gras, on peut citer acide arachidonique, acide linoléique, acide linolénique,  
20 acide laurique, acide nervonique, acide palmitique, acide oléique, etc.

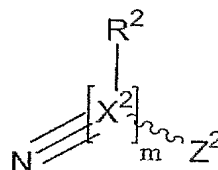
Parmi les glycolipides, on peut citer galactosyl-céramique, glucosyl-céramide, gangliosides, les cérébrosides (acide gras + sphingosine + 1 sucre),  
25 les gangliosides (acide gras + sphingosine + nombreux sucres, de l'acide neuraminique), etc.

Parmi les glycolipoprotéines, on peut citer MPB83 (marque de commerce), GLP19 (marque de commerce) et IRBP (marque de commerce).

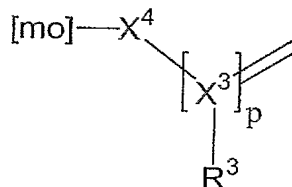
La présente invention se rapporte également à un procédé de fixation covalente d'une unité moléculaire [mo] sur un support solide par l'intermédiaire d'un bras espaceur, avantageusement celui de la présente invention.

Le procédé peut comprendre les étapes suivantes :

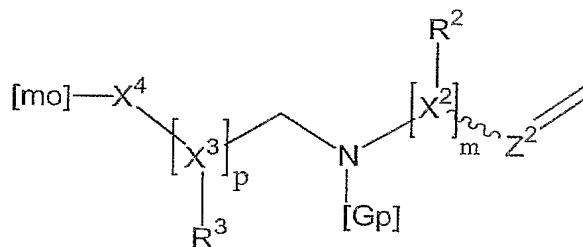
(i) réduction de la fonction nitrile d'un composé de formule :



(ii) formation d'une fonction aldéhyde à partir d'une fonction allyle d'une molécule biologique de formule :

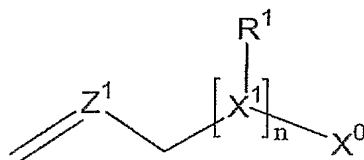


(iii) amination réductrice entre ladite fonction nitrile réduite suivie d'une protection de l'amine secondaire formée et ladite fonction aldéhyde pour obtenir une molécule biologique activée pour sa fixation sur le support, ladite molécule biologique activée étant de formule :





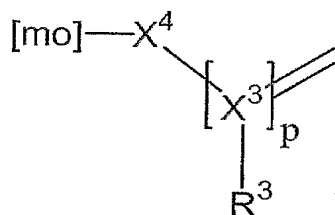
(iv) silanisation d'un support solide, et fonctionnalisation du support solide silanisé avec une molécule de formule :



5 (v) réaction de métathèse entre la molécule fonctionnalisant le support et la molécule biologique activée pour former un bras espaceur selon l'invention reliant la molécule biologique et le support.

10 Dans ce procédé, les substituants  $\text{X}^0$  ;  $\text{X}^1$  ;  $\text{X}^2$  ;  $\text{X}^3$  ;  $\text{X}^4$  ;  $\text{Z}^1$  ;  $\text{Z}^2$  ;  $\text{R}^1$  ;  $\text{R}^2$  ;  $\text{R}^3$  ; et [mo] sont tels que définis ci-dessus.

Selon l'invention, le composé de formule



15 peut être par exemple un sucre allylé, [mo] étant ledit sucre. Ce sucre allylé peut être obtenu par tout procédé connu de l'homme du métier qui n'altère pas le sucre. Il peut s'agir par exemple du procédé décrit dans le document [5].

20 Selon l'invention, l'amine secondaire peut en outre être protégée par un groupement protecteur. Ainsi, le procédé de l'invention peut comprendre en outre une étape de fixation d'un groupement protecteur [Gp] sur la fonction amine secondaire. Le groupement protecteur peut être tel que défini ci-dessus. Sa

fixation sur l'amine secondaire peut se faire par tout procédé chimique connu de l'homme du métier, par exemple suivant un des procédés décrits dans le document [7].

5            Pour mettre en œuvre les différentes étapes de ce procédé de l'invention, les procédés classiques de chimie organique connus de l'homme du métier peuvent être utilisés. Ainsi, à titre d'exemple, pour l'étape de réduction du nitrile, le procédé décrit dans le  
10 document [6] peut être utilisé. Pour l'étape de formation d'une fonction aldéhyde à partir d'une fonction allyle d'une molécule biologique, le procédé d'ozonolyse décrit dans le document [5] peut être utilisé. Pour l'étape d'amination réductrice suivie  
15 d'une protection de l'azote entre le nitrile réduit et ladite fonction aldéhyde pour obtenir une molécule biologique activée, le procédé décrit dans le document [7] peut être utilisé. Pour l'étape de silanisation du support solide et de sa fonctionnalisation, le procédé  
20 décrit dans le document [8] peut être utilisé. Pour la réaction de métathèse, le procédé décrit dans le document [10] peut être utilisé.

          Le bras espaceur de la présente invention peut donc être créé à partir de trois parties qui sont liées  
25 d'une part par amination réductrice suivie d'une protection de l'azote du côté de l'unité moléculaire, et d'autre part lors d'une réaction de métathèse de Grubbs. La métathèse de Grubbs est par exemple décrite dans le document [11].

L'atome d'azote qui est inséré dans la chaîne carbonée présente plusieurs avantages : obtenu lors de l'accrochage de deux chaînons, il se trouve sous la forme d'une amine secondaire que l'on peut protéger de différentes manières pour conférer une réactivité particulière à l'espaceur. Cette fonction avantageusement modulable au cas par cas par différents groupements protecteurs ou par une molécule participant à la fonctionnalité du bras espaceur, permet de faire varier et de maîtriser l'hydrophilie ou l'hydrophobie du bras espaceur et de contrôler son encombrement stérique. Il est aussi avantageusement possible de moduler le caractère électrophile/nucléophile ou acide/basique de cette partie du bras espaceur : la nature des groupements protecteurs de l'atome d'azote est donc de préférence choisie dans le but d'optimiser des conditions de réactions, d'interactions, d'opérations de caractérisations ou d'analyses, et ce, que ce soit avant ou après clivage de l'espaceur pour libérer l'unité moléculaire. Par exemple avec un groupement acétyle on obtient du fait de sa petite taille un faible encombrement stérique, ce qui permet une optimisation de la reconnaissance moléculaire lors de l'utilisation du bras espaceur, par exemple sur une puce à molécules. Par exemple aussi, avec un groupement butyle, on obtient un substituant carboné hydrophobe qui rend cette partie du bras espaceur hydrophobe, ce qui permet par exemple une reconnaissance de protéines hydrophiles plus spécifique, plus sélective, vis-à-vis des parties hydrophiles du bras espaceur ([mo]).

La présente invention fournit donc un bras espaceur (ou « espaceur ») modulable, dont les différentes structures influencent la réactivité du bras, c'est-à-dire son comportement chimique et/ou électrochimique et/ou stérique.

La présente invention est réalisable de manière simple et efficace et l'espaceur présente avantageusement les trois propriétés suivantes, notamment lorsqu'il est mis en œuvre pour la fabrication de puces à sucres :

- tout d'abord, l'espaceur occupe bien la fonction de bras permettant d'éloigner la chaîne sucrée de la surface solide qui supporte cette chaîne.

- ensuite l'espaceur est un bras clivable : il est possible d'ouvrir facilement et de manière ciblée l'espaceur pour isoler le sucre de la phase supportée.

- enfin, l'espaceur, de par son faible taux de fonctionnalité chimique, reste inerte dans de nombreuses conditions de réactions réalisées lors de synthèses organiques sur des unités sucrées par exemple et lors de l'utilisation des puces à sucres.

Outre les avantages précités, les inventeurs ont noté les suivants lors des différentes expérimentations de mise en œuvre de la présente invention :

- Le bras espaceur permet de pallier les problèmes stériques dus à la présence du support

solide. Il permet d'étudier dans de bonnes conditions stériques les interactions protéines/sucres sur les puces à sucre obtenues. Il résout les problèmes d'encombrement stérique qui se présentaient dans l'art  
5 antérieur lors de l'approche de la protéine vers les ligands sucrés et nuisaient aux futures interactions potentielles.

- La longueur du bras est modulable : un choix judicieux d'homologues fonctionnels de tailles  
10 différentes, en particulier par le choix des réactifs de départ, permet de préparer des espaceurs de tailles différentes.

- Il est non seulement possible de choisir la distance entre la chaîne sucrée et le support solide  
15 mais aussi de contrôler le caractère hydrophile ou hydrophobe de cette partie de l'espace au moyen du groupement protecteur.

- La simplicité de la structure chimique de l'espaceur lui confère des propriétés de non  
20 réactivité chimique lors des nombreuses réactions organiques lors de sa fabrication et lors de l'utilisation de la puce à sucre.

- L'espaceur, de par son absence de fonctions chimiques interactives n'a pas d'influence sur des  
25 interactions potentielles avec d'autres molécules, lorsque le système est utilisé dans le cadre d'une puce à sucre ou plus généralement d'une puce à petites molécules.

- L'espaceur est clivable de manière précise  
30 et sélective au niveau de sa double liaison  $C=C$ , dans

des conditions de réactions qui n'altèrent pas la molécule biologique, par exemple oligosaccharidique. En effet, on peut utiliser commodément pour le clivage par exemple une ozonolyse ( $O_3$ ), une métathèse de Grubbs (catalyseur de Grubbs), ou une dihydroxylation suivie d'une coupure oxydative de diolsmylation ( $OsO_4$ ,  $NaIO_4$ ), et d'autres réactions chimiques douces connues de l'homme du métier.

- Le fait que l'espaceur soit aisément clivable, et que cette coupure ne modifie pas la structure du sucre, permet de réaliser des contrôles analytiques structuraux et conformationnels de la chaîne oligosaccharidique isolée. Il est en outre aisé de calculer la quantité de sondes sucrées accrochées (« loading ») sur le support solide pendant la synthèse sucrée.

Un des intérêts de cet espaceur, en comparaison avec celui décrit dans le document [1] (l'octènediol par exemple) réside dans l'adaptabilité de sa longueur, de sa fonctionnalité, de sa réactivité et de l'encombrement stérique qui peuvent être générés à volonté.

Les inventeurs notent également que l'espaceur de la présente invention permet la liaison avec une très grande gamme de saccharides, d'oligosaccharides ou polysaccharides qui sont très souvent présynthétisés et protégés en position anomérique de leur partie réductrice par un groupement allyle. En une étape, ces unités sucrées peuvent en effet être transformées pour se lier directement sur l'espaceur. Ainsi, cet espaceur

est avantageusement compatible avec de nombreuses molécules sucrées déjà synthétisées et décrites dans la littérature, par exemple dans les documents [7], [12] et [13].

5           La présente invention peut par exemple être utilisée pour la fabrication d'une puce à sucres, par exemple d'une puce susceptible d'identifier par criblage des séquences oligosaccharidiques reconnaissant une protéine particulière, par exemple  
10   suivant la technique décrite dans le document [1]. Dans cette application, la présente invention permet d'optimiser les procédés de criblage et donc de disposer plus efficacement et plus rapidement de molécules à visée thérapeutique ou biotechnologique. On  
15   peut s'attendre à ce que cette capacité existe également dans les autres applications de la présente invention.

          La présente invention peut également être utilisée sur les biopuces où un bras espaceur doit  
20   faire le lien entre le support solide et des sondes d'oligopeptides, d'oligonucléotides et/ou d'oligosaccharides. En particulier, le bras espaceur de la présente invention peut être utilisé sur une puce à oligopeptides telle que celle décrite dans le document  
25   [3], sur une puce à oligosaccharides telle que celle décrite dans le document [4].

          D'autres caractéristiques et avantages apparaîtront encore à l'homme du métier à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre illustratif.

### Exemples

A titre d'exemple, la synthèse d'un espaceur de longueur correspondant à une chaîne de quatorze carbonés est exposée ci-dessous, en utilisant des protocoles opératoires choisis parmi ceux accessibles à l'homme du métier. Les références en caractères gras renvoient au schéma réactionnel ci-dessous.

Les composés choisis sont : un monosaccharide (1) du type glucose (1) (N-acétylglucosamine (GlcNac) : sucre allylé en position 1) constituant l'unité moléculaire [mo] ; le 4-pentènenitrile (3) portant la fonction nitrile à réduire ; et le 7-octényltriméthoxysilane (8) pour la fonctionnalisation du support. Le support solide est constitué par des billes (6) Controlled Pore Glass (CPG) (marque de commerce) à base de silice.

Le schéma réactionnel ci-dessous résume l'ensemble des réactions chimiques entreprises dans ces exemples pour la fixation d'un oligosaccharide (1) sur un support (6) au moyen d'un bras espaceur conforme à la présente invention. Ces réactions chimiques sont indiquées par les lettres A à F. Un exemple d'une réaction de clivage du bras espaceur est présenté dans l'exemple G ci-dessous.

Sur ce schéma réactionnel, les groupements « R » indiqués sur le sucre n'ont pas été différenciés volontairement pour simplifier la représentation. Ces « R » représentent des substituants, identiques ou différents entre eux aux différentes positions sur le



cycle formant le sucre, et pouvant les substituants rencontrés généralement sur les sucres. Dans l'exemple particulier présenté ici, le sucre utilisé étant le N-acétylglucosamine, l'homme du métier n'a aucune  
5 difficulté pour identifier les substituants « R » aux différentes positions des composés (1), (2), (5) et (10).

**Exemple A : Activation de l'oligosaccharide**  
10 (réaction A)

Une réaction d'ozonolyse est utilisée dans cet exemple. Le procédé utilisé est décrit dans le document [5]

Le sucre allylé en position anomérique (1)  
15 (0,93 mmol) est dissous dans 5 ml d'un mélange de dichlorométhane et de méthanol (1/1) : le milieu est plongé dans un bain froid à une température de  $-78^{\circ}\text{C}$  (acétone + carboglace). L'ozone  $\text{O}_3$  doit alors barboter dans la solution : dès l'apparition de la couleur bleue  
20 (caractéristique d'un excès d'ozone), l'ozone est remplacée par l'argon (ou l'azote). La réaction étant terminée, le milieu est rendu réducteur par ajout de diméthylsulfure  $\text{Me}_2\text{S}$  (4,65 mmol, 5 éq) : il se forme alors du diméthylsulfoxyde DMSO. Le milieu remonte  
25 lentement à température ambiante pendant une nuit, puis est évaporé sous vide : le résidu organique est repris au diéthyléther  $\text{Et}_2\text{O}$ , et lavé à l'eau. Les phases organiques sont évaporées sous vide, puis co-évaporées au toluène. Le produit brut est purifié par

chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : éther de pétrole/acétate d'éthyle : 8/2).

Ainsi, l'aldéhyde (2) est obtenu avec un rendement de 75%.

5

**Exemple B : Réduction d'un nitrile (réaction B)**

Le procédé chimique utilisé est décrit dans le document [6].

L'hydrure de lithium aluminium  $\text{LiAlH}_4$  (381 mg, 10,03 mmol, 1 éq) est introduit dans le diéther fraîchement distillé (20 ml).

Le 4-pentènenitrile (3) (814 mg, 1 ml, 10,03 mmol) est ajouté lentement au milieu réactionnel agité sous atmosphère d'azote, à une température de 0°C (bain de glace). L'agitation doit continuer environ 20 minutes à température ambiante.

Ensuite de l'eau (0,4 ml), puis une solution de soude à 20% dans l'eau (0,3 ml), et enfin une autre quantité d'eau (1,4 ml) sont additionnées : ces ajouts doivent être réalisés avec beaucoup de précaution car la neutralisation peut être violente. Lorsque la solution de diéther est décantée du résidu blanc inorganique, le surnageant est extrait.

Le solide (résidu) blanc est lavé à deux reprises au diéther, et les phases organiques sont réunies. Une solution d'acide chlorhydrique  $\text{HCl}$  3 M est ajoutée à cette phase organique pour obtenir un pH acide ( $\text{pH} < 7$ ) : le 4-pentènenitrile n'ayant pas réagi reste dans la phase étherée, alors que l'amine passe en phase aqueuse.

Après extraction, la phase aqueuse est donc conservée et se voit ajouter une solution de soude NaOH 3 M pour passer à un pH basique ( $\text{pH} > 7$ ) : le produit aminé va alors passer dans la phase étherée pendant  
 5 cette nouvelle extraction. La phase étherée ainsi extraite est séchée sur sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ), puis évaporée sous vide (évaporateur rotatif).

L'amine brute (4) est alors purifiée par distillation fractionnée (four à boules,  $T \approx 96^\circ\text{C} \pm 9^\circ\text{C}$ ).

10

Analyse  $^1\text{H}$  RMN (Brücker AM 250) :

5,82 (ddt,  $^3J_{\text{trans}}=18$  Hz,  $^3J_{\text{cis}}=13$  Hz,  $^3J(\text{H}^{\text{I}})=6,5$  Hz, 1H,  $\text{CH}=\text{}$ ), 5,00 (m, 2H,  $\text{CH}_2=\text{}$ ), 2,70 (t,  $^3J_{\text{II}}=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{III}}$ ), 2,10 (ttd,  $^3J(\text{H}_{\text{II}})=6,5$  Hz,  $^3J(\text{HC})=6,5$  Hz,  $^3J(\text{H}_2\text{C}-)=1,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_\text{I}$ ), 1,70 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 1,56 (quint.,  $^3J(\text{H}_{\text{II}})=^3J(\text{H}_{\text{III}})=6,5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{II}}$ ).

15

Analyse  $^{13}\text{C}$  RMN (Brücker AM 250) :

138,6 ( $\text{CH}=\text{}$ ), 114,6 ( $\text{CH}_2=\text{}$ ), 42,0 ( $\text{CH}_2\text{-N}$ ),  
 20 33,1 ( $\text{CH}_2$ ), 31,4 ( $\text{CH}_2$ ).

### Exemple C : Amination réductrice (réaction C)

Le procédé chimique utilisé est décrit dans le document [7].

25

L'aldéhyde (2) (20,87 mmol) est mis en solution dans le diméthylformamide (1,2 ml) fraîchement distillé sur hydrure de calcium ( $\text{CaH}_2$ ) : le milieu est mis sous agitation et l'amine (4) (31,30 mmol, 2 équ) est additionnée. Après une vingtaine de minutes, le  
 30 cyanoborohydrure de sodium  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (83,47 mmol, 4 équ)

est ajouté au mélange, qui est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit.

Si la réaction n'est pas terminée, il est possible de rajouter du  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  (1 éq). Ensuite, 5 lorsque la réaction est terminée, la pyridine (2,4 ml) et l'anhydride acétique  $\text{Ac}_2\text{O}$  (83,47 mmol, 2 éq/amine) sont ajoutés au mélange.

Lorsque la réaction est terminée (environ 1 heure après l'addition), le composé brut est extrait au 10 diéthyldéther et à l'eau. Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ), puis filtrées, évaporées sous vide puis co-évaporées au toluène.

Le composé (5) est alors purifié par 15 chromatographie sur gel de silice (gradient d'éluant cyclohexane/acétate d'éthyle de 7/3 à 5/5).

**Exemple D : Fonctionnalisation du support solide (réactions D et E)**

20 Le procédé chimique utilisé est décrit dans le document [7].

Les billes Controlled Pore Glass (6) (CPG, 500 Å, 2 g) sont agitées de manière très douce pendant 2 heures à température ambiante dans une solution de 25 soude  $\text{NaOH}$  (700 mg) dans l'eau désionisée EDI (6 ml) et l'éthanol  $\text{EtOH}$  à 99% (8 ml). Puis les billes sont centrifugées, le surnageant est extrait, les billes sont lavées abondamment à l'EDI pour atteindre un pH neutre.

Les billes sont ensuite séchées sous vide (évaporateur rotatif), et restent 1 heure à température ambiante dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,2 N) avant d'être lavées à l'eau, centrifugées, 5 séchées puis mises à l'étuve pendant 15 minutes à 80°C. Elles sont alors lavées à l'éthanol, puis au toluène (centrifugeuse).

Elles sont ensuite séchées avant de participer à l'étape suivante de silanisation dont le mélange 10 réactionnel aura été préparé juste avant l'emploi.

Les billes CPG (7) sont introduites dans un mélange de toluène (45 ml), triéthylamine  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,35 ml) et de 7-octényltriméthoxysilane (8) ( $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Si}$ , M 232,39, 100  $\mu\text{l}$ ) : le milieu réactionnel 15 est mis à 80°C pendant 16 heures (étuve).

Les billes sont extraites du mélange par centrifugation, et sont rincées à l'éthanol à plusieurs reprises puis séchées (évaporateur rotatif). Elles sont alors soumises à une température de 110°C pendant 3 20 heures pour réaliser l'étape de réticulation (étuve).

Les étapes de silanisation et de réticulation étant ainsi réalisées, il est nécessaire de neutraliser l'acidité et l'hydrophilie résiduelles des silanols de surface n'ayant pas réagi au cours de l'étape de 25 silanisation (« end-capping »). Une solution de chlorure de triméthylsilyle  $\text{TMSCl}$  (109 mg, 130  $\mu\text{l}$ ) et de triéthylamine  $\text{Et}_3\text{N}$  (506 mg, 700  $\mu\text{l}$ ) dans le dichlorométhane DCM (10 ml) est ajoutée aux billes CPG silanisées, et le mélange est laissé sous agitation 30 douce pendant 2 heures à 25°C.

Les billes sont alors rincées abondamment au dichlorométhane (centrifugeuse), puis à l'acétonitrile (centrifugeuse). Elles sont ensuite séchées sous vide (évaporateur rotatif), et mises à l'étuve (80°C) pour  
5 parfaire le séchage.

Les billes silanisées (9) sont ainsi obtenues.

**Exemple F : Réaction de métathèse (réaction F)**

Le procédé chimique utilisé est décrit dans le  
10 document [9].

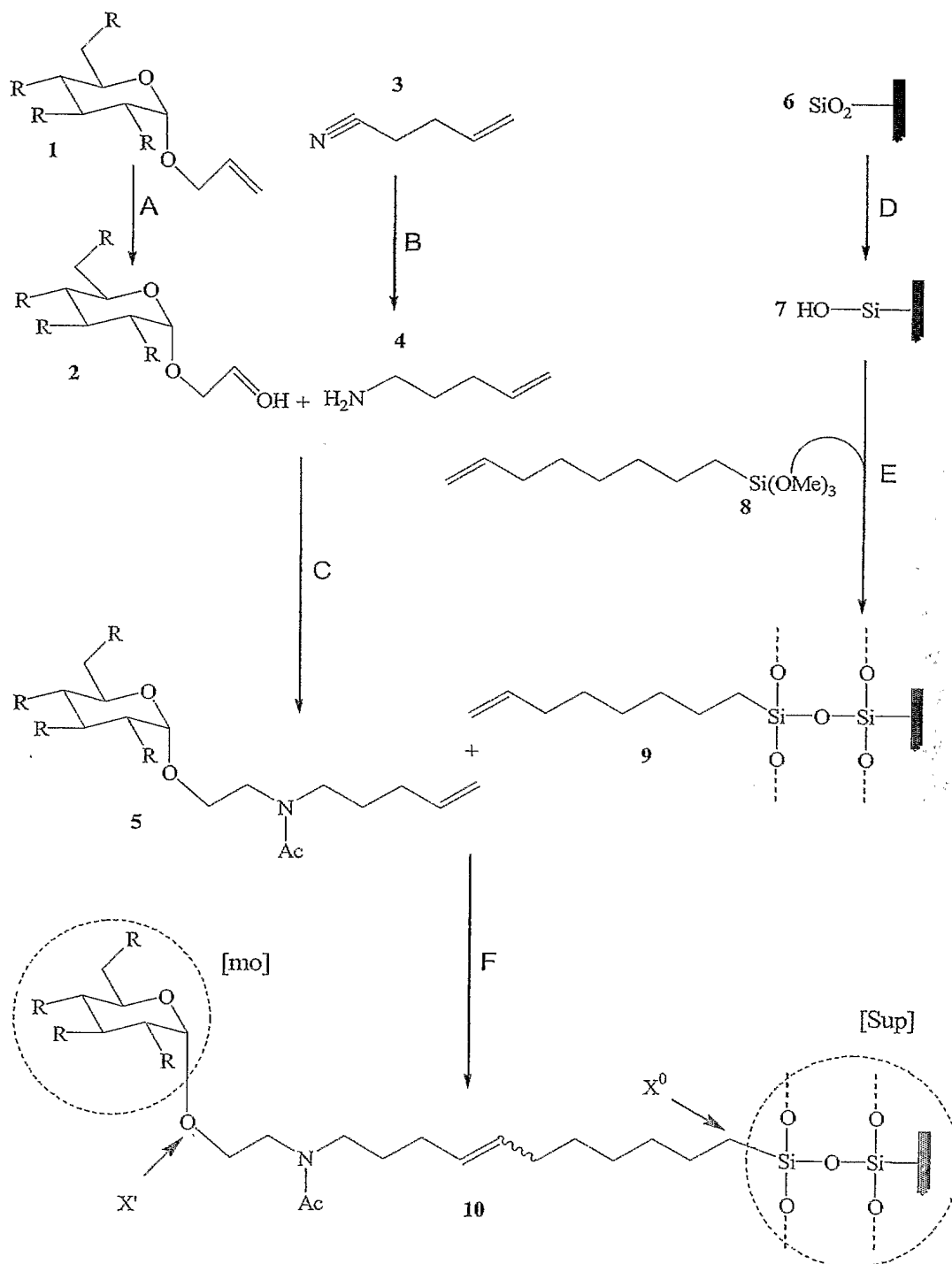
Les billes CPG silanisées (9) (2 g, 30  $\mu\text{mol/g}$ ) sont mises sous agitation dans le dichlorométhane (20 ml), sous atmosphère d'azote. Le système sucre-  
espaceur (5) (300  $\mu\text{mol}$ , >5 éq) est alors additionné, au  
15 milieu, avec un catalyseur de Grubbs (6  $\mu\text{mol}$ , 5 mg, 0,1 éq). Le milieu réactionnel est alors porté à reflux, soit une température de 44°C.

Après 6 heures, une autre portion de catalyseur de Grubbs (6  $\mu\text{mol}$ , 5 mg, 0,1 éq) est ajoutée. Le  
20 mélange est maintenu à 44°C pendant encore 6 heures, puis est ramené à température ambiante.

Les billes sont filtrées, et lavées abondamment au dichlorométhane et à l'éthanol (centrifugeuse). Les billes sont ensuite évaporées sous vide pour être  
25 séchées.

Les billes sucrées (10) sont ainsi obtenues.

## Schéma réactionnel des exemples A à F

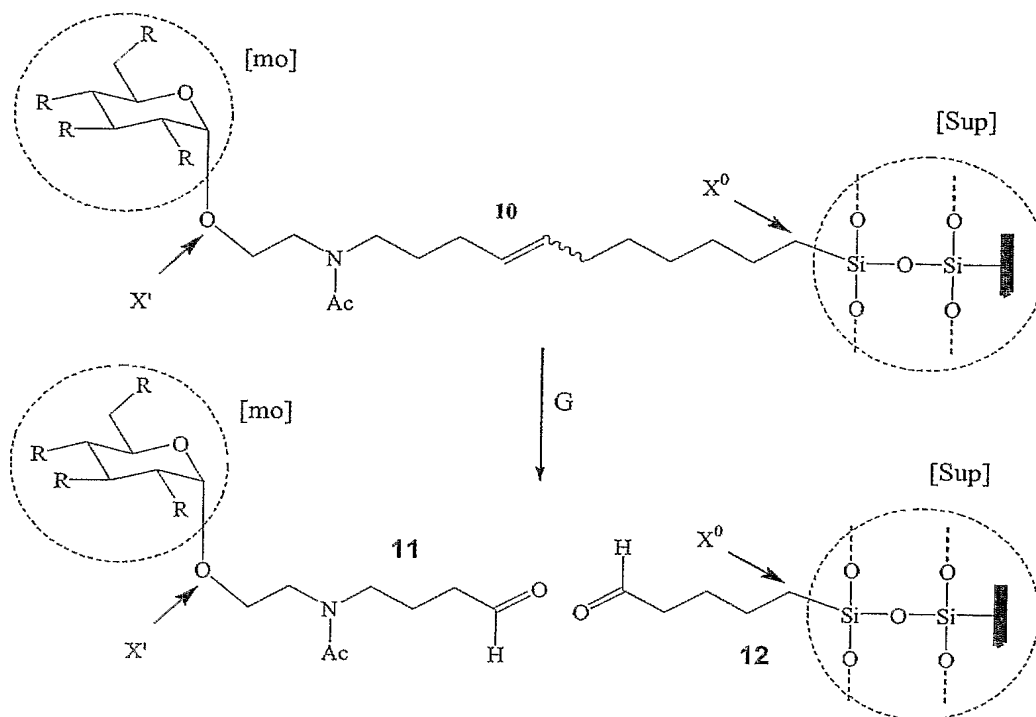


**Exemple G : Clivage de la sonde (réaction G)**

Le procédé chimique utilisé est décrit dans le document [10].

Lorsque le système (10) (support solide-  
 5 espaceur de la présente invention-chaîne oligosaccharidique) a été obtenu, il est possible de cliver l'espaceur, sans dénaturer la chaîne sucrée.

Le protocole expérimental est décrit dans le document [5]. L'équation chimique est la suivante :



10

Les billes CPG sucrées (10) sont mises sous  
 agitation lente dans un mélange  
 15 dichlorométhane/méthanol 1/1. Le milieu est amené à une  
 température de -78°C (acétone+azote liquide).



Ensuite, on fait buller l'ozone  $O_3$  dans le milieu réactionnel jusqu'à ce qu'une couleur bleue apparaisse.

5 Ensuite, de l'argon bulle quelques minutes dans le mélange, avant de neutraliser le milieu avec du diméthylsulfure puis le milieu réactionnel est laissé pour remonter vers la température ambiante pendant une nuit.

10 Les billes sont reprises au diéthyldéther, filtrées, rincées à plusieurs reprises au diéthyldéther et à l'eau.

Les billes (12) sont alors mises de côté, et le surnageant est extrait (diéthyldéther/eau), la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium  $MgSO_4$ ,  
15 évaporée sous vide et co-évaporée au toluène.

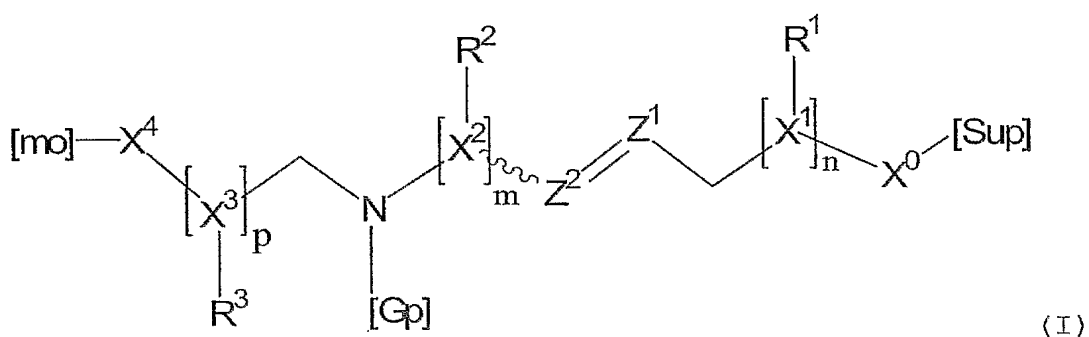
Le produit (11) est alors obtenu.

## Références bibliographiques

- [1] WO-A-03/008927 : Dukler, N. Dotan, A. Shtavi, A. Gargir.
- 5 [2] H.M.I. Osborn, T.H. Khan, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 1807-1850.
- [3] D.A. Stetsenko, M.J. Gai, *Bioconjugate Chemistry*, **2001**, 12, 576-586.
- [4] US-A-6,579,725 : P.H. Seeberger, R.B. Andrade.
- 10 [5] R. Roy, C.A. Laferrière, *Canadian Journal of Chemistry*, **1990**, 68, 2045-2054.
- [6] L.H. Amundsen, L.S. Nelson, *Journal of the American Chemical Society*, **1951**, 73, 242-244.
- [7] J.F. Tolborg, K.J. Jensen, *Chemical Communication*, **2000**, 147-148.
- 15 [8] F. Vinet, A. Hoang, EN 00 16940.
- [9] K. Biswas, D.M. Coltart, S.J. Danishefsky, *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 6107-6110.
- [10] C. Sylvain, A. Wagner, C. Miokowski, *Tetrahedron Letters*, **1997**, 38, 1043-1044.
- 20 [11] Q.J. Plante, E.R. Palmacci, P.H. Seeberger, *Science*, **2001**, 291, 1523-1527.
- [12] P.H. Seeberger, *Chem. Com.*, **2003**, 1115-1121.
- [13] D.M. Ratner, E.R. Swanson, P.H. Seeberger, *Org. Lett.* **2003**, 4717-4720.
- 25

## REVENDICATIONS

1. Bras espaceur moléculaire de formule (I) suivante :



- dans laquelle les substituants  $X^0$  ;  $X^1$  ;  $X^2$  ;  $X^3$  ;  $X^4$  ;  $Z^1$  ;  $Z^2$  ;  $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont tels que :

- $X^0$  et  $X^4$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Se, P, As, Si ;
- $X^1$  ;  $X^2$  ; et  $X^3$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Se, P, As, Si et parmi un aryle et un hétéroaryle comprenant chacun de 2 à 20 atomes de carbone ;
- $Z^1$  et  $Z^2$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi C-R, Si-R, C, N, P et As, où R est un alkyle comprenant de 1 à 40 atomes de carbone ;
- $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont chacun choisis indépendamment des autres substituants parmi H, un alkyle, un aryle et un hétéroaryle comprenant chacun de 2 à 20 atomes de carbone ;

- [Gp] représente un groupement protecteur de l'amine secondaire -N- ou une molécule participant à la fonctionnalité du bras espaceur ;
- dans laquelle n, m et p sont des nombres entiers, chacun supérieur ou égal à 1 et choisi indépendamment l'un de l'autre, de préférence de façon à ce que  $1 \leq n, m \text{ et } p \leq 40$  ;
- dans laquelle [Sup] représente H ou un support solide silanisé sur lequel ledit bras espaceur peut être fixé de manière covalente ; et
- dans laquelle [mo] représente H ou une unité moléculaire destinée à être fixée de manière covalente par l'intermédiaire dudit bras espaceur sur ledit support solide silanisé.

15

2. Bras espaceur selon la revendication 1, dans lequel

- $X^0$  et  $X^4$  sont choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Si ; et/ou
- $X^1$  ;  $X^2$  ; et  $X^3$  sont choisis indépendamment des autres substituants parmi C, O, N, S, Si et parmi un aryle et un hétéroaryle comprenant chacun de 2 à 10 atomes de carbone ; et/ou
- $Z^1$  et  $Z^2$  sont choisis indépendamment des autres substituants parmi C, N, C-R, Si-R, où R est un alkyle comprenant de 1 à 30 atomes de carbone ; et/ou
- $R^1$  ;  $R^2$  ; et  $R^3$  sont choisis indépendamment des autres substituants parmi H, un alkyle, un aryle

et un hétéroaryle comprenant chacun de 2 à 10 atomes de carbone.

3 Bras espaceur selon la revendication 1,  
5 dans lequel le groupement protecteur [Gp] est choisi parmi Ac, Benzyle, un groupement aryle en C<sub>1</sub> à C<sub>40</sub>, Troc, z, TCA, BOC, Fmoc.

4. Bras espaceur selon la revendication 1,  
10 dans lequel le support solide [Sup], lorsqu'il est présent, est choisi parmi une plaque, une bille ou un capillaire.

5. Bras espaceur selon la revendication 1 ou  
15 4, dans lequel [Sup] est à base de silice ou de verre.

6. Bras espaceur selon la revendication 1,  
dans lequel [mo], lorsqu'il est présent, est une  
molécule ayant un poids moléculaire allant de 180 à  
20 400000 g.mol<sup>-1</sup>.

7. Bras espaceur selon la revendication 1,  
dans lequel [mo], lorsqu'il est présent, est choisi  
parmi les monosaccharides, les oligosaccharides, les  
25 poly-oligosaccharides, les glyco-conjugués, les  
peptides, les protéines, les enzymes, les  
glycoprotéines, les lipides, les acides gras, les  
glycolipides, les glycolipoprotéines.

8. Bras espaceur selon la revendication 1, dans lequel [mo], lorsqu'il est présent, est un sucre.

5 9. Utilisation d'un bras espaceur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour fixer sur un support solide silanisé [Sup] une unité moléculaire [mo].

10 10. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle [mo] est une molécule ayant un poids moléculaire allant de 180 à 400000 g.mol<sup>-1</sup>.

15 11. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle [mo] est choisi parmi les monosaccharides, les oligosaccharides, les poly-oligosaccharides, les glyco-conjugués, les petites molécules naturelles ou synthétiques ; et [Sup] représente un support solide silanisé auquel le bras espaceur est susceptible d'être fixé et

20

12. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle [Sup] est choisi parmi une plaque, des billes ou un capillaire.

25

13. Utilisation selon la revendication 12, dans laquelle [Sup] est à base de silice ou de verre.

30 14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 13 pour la fabrication d'une biopuce.

8. Bras espaceur selon la revendication 1, dans lequel [mo], lorsqu'il est présent, est un sucre.

5 9. Utilisation d'un bras espaceur selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 pour fixer sur un support solide silanisé [Sup] une unité moléculaire [mo].

10 10. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle [mo] est une molécule ayant un poids moléculaire allant de 180 à 400000 g.mol<sup>-1</sup>.

15 11. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle [mo] est choisi parmi les monosaccharides, les oligosaccharides, les poly-oligosaccharides, les glyco-conjugués, les petites molécules naturelles ou synthétiques ; et [Sup] représente un support solide silanisé auquel le bras espaceur est susceptible d'être fixé.

20

12. Utilisation selon la revendication 9, dans laquelle [Sup] est choisi parmi une plaque, des billes ou un capillaire.

25 13. Utilisation selon la revendication 12, dans laquelle [Sup] est à base de silice ou de verre.

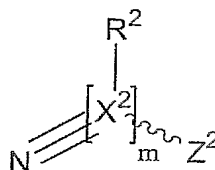
30 14. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 13 pour la fabrication d'une biopuce.

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 9 à 13 pour la fabrication d'une puce à sucre.

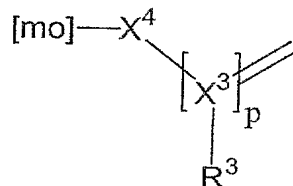
5

16. Procédé de fixation covalente d'une unité moléculaire [mo] sur un support par l'intermédiaire d'un bras espaceur, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- 10 (i) réduction de la fonction nitrile d'un composé de formule :



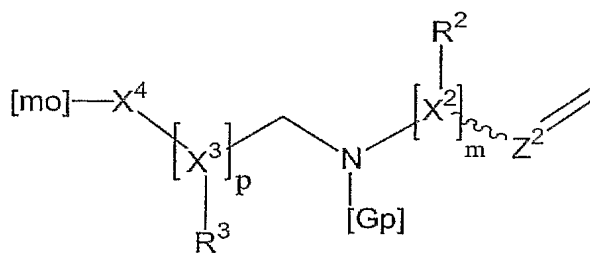
- (ii) formation d'une fonction aldéhyde à partir d'une fonction allyle d'une molécule biologique de formule :



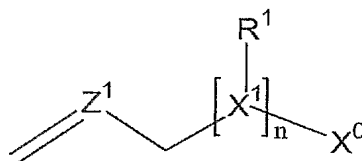
15

- (iii) amination réductrice entre ladite fonction nitrile réduite suivie d'une protection de l'amine secondaire formée et ladite fonction aldéhyde pour obtenir une molécule biologique activée pour sa fixation sur le support, ladite molécule biologique activée étant de formule :
- 20





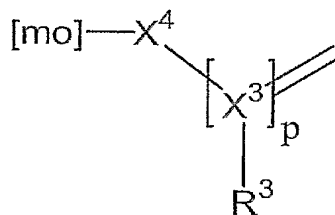
(iv) silanisation d'un support solide, et fonctionnalisation du support solide silanisé avec une molécule de formule :



(v) réaction de métathèse entre la molécule fonctionnalisant le support et la molécule biologique activée pour former un bras espaceur selon l'invention reliant la molécule biologique et le support ;

procédé dans lequel les substituants  $\text{X}^0$  ;  $\text{X}^1$  ;  $\text{X}^2$  ;  $\text{X}^3$  ;  $\text{X}^4$  ;  $\text{Z}^1$  ;  $\text{Z}^2$  ;  $\text{R}^1$  ;  $\text{R}^2$  ;  $\text{R}^3$  ; et [mo] sont tels que définis dans la revendication 1.

17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel le composé de formule



est un sucre allylé, [mo] étant ledit sucre.

18. Procédé selon la revendication 16, dans lequel [Sup] est choisi parmi une plaque, une bille ou un capillaire.

5 19. Procédé selon la revendication 16 ou 18, dans lequel [Sup] est à base de silice ou de verre.

20. Procédé selon la revendication 16, dans lequel [mo] est une molécule ayant un poids moléculaire  
10 allant de 180 à 400000 g.mol<sup>-1</sup>.

21. Procédé selon la revendication 16, dans lequel [mo] est choisi parmi les monosaccharides, les oligosaccharides, les poly-oligosaccharides, les glyco-  
15 conjugués, les peptides, les protéines, les enzymes, les glycoprotéines, les lipides, les acides gras, les glycolipides, les glycolipoprotéines.

22. Procédé selon la revendication 16, dans  
20 lequel [mo] est un sucre.

23. Procédé selon la revendication 16, comprenant en outre une étape de fixation d'un groupement protecteur [Gp] sur la fonction amine  
25 secondaire.

24. Procédé selon la revendication 23, dans lequel [Gp] est choisi parmi Ac, benzyle, un groupement aryle en C<sub>1</sub> à 40, Troc, z, TCA, BOC, Fmoc.

25. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 24 pour la fabrication d'une biopuce.

5            26. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 16 à 24 pour la fabrication d'une puce à sucre.



## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

### Désignation de l'inventeur

Vos références pour ce dossier	B14647EE- DD2682
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	
	BRAS ESPACEUR MOLECULAIRE, PROCEDE DE FABRICATION, ET UTILISATIONS SUR UNE PUCE D'ANALYSE A MOLECULES OU BIOMOLECULES.
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	PERETTI
Prénoms	Véronique
Rue	3 Impasse du Pré
Code postal et ville	31190 GREPIAC
Société d'appartenance	
Inventeur 2	
Nom	VINET
Prénoms	Françoise
Rue	22 Bld E. Rey
Code postal et ville	38000 GRENOBLE
Société d'appartenance	
Inventeur 3	
Nom	BONNAFFE
Prénoms	David
Rue	4 rue des Tournelles
Code postal et ville	75004 PARIS
Société d'appartenance	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

#### Signé par

Signataire: FR, Brevatome, J. Lehu

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

#### Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



PCT/FR2005/050117

